

527, 195

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

Rec'd PCT/PTO

10 MAR 2005

(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/030702 A1

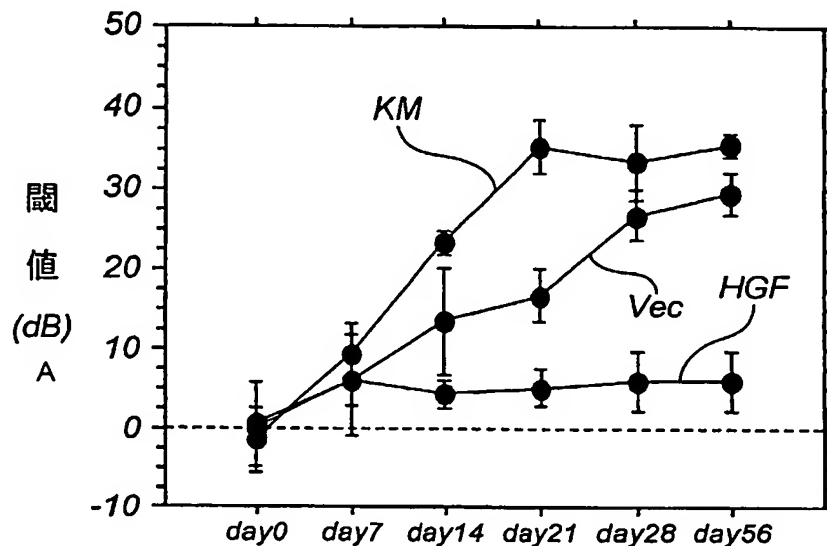
(51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/00, A61P 27/16  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012674  
(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2002-289639 2002 年 10 月 2 日 (02.10.2002) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェ  
ス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒  
560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町一丁目四番二号  
Osaka (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金田 安史  
(KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府  
箕面市 小野原東 6-1 2-8 Osaka (JP). 大島 一  
男 (OSHIMA, Kazuo) [JP/JP]; 〒562-0025 大阪府 箕  
面市 粟生外院 1-19-21-302 Osaka (JP). 森下 竜一  
(MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府 大  
阪市 淀川区宮原 2-1 1-2 2-5 0 2 Osaka (JP). 久  
保 武 (KUBO, Takeshi) [JP/JP]; 〒657-0016 兵庫県 神  
戸市 灘区篠原台 2 0-8 Hyogo (JP).  
(74) 代理人: 古谷 聡, 外 (FURUYA, Satoshi et al.); 〒103-  
0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2-1 7-8 浜町花長  
ビル 6 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: DRUG FOR AUDITORY DYSFUNCTION

(54) 発明の名称: 聴覚機能障害用医薬



A...THRESHOLD (dB)

(57) Abstract: It is intended to provide a drug for auditory dysfunction which is appropriately usable in gene therapy for auditory dysfunction. Namely, a drug for auditory dysfunction which contains as the active ingredient a hepatocyte growth factor (HGF) gene or a virus envelope vector having its plasmid enclosed therein. This drug is appropriately usable particularly as a gene therapeutic for preventing or treating auditory disturbance.

(57) 要約: 本発明は、聴覚機能障害の遺伝子治療用として適した聴覚機能障害用医薬を提供する。すなわち、肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬である。特に難聴の予防、治療を目的とする遺伝子治療用

[続葉有]



WO 2004/030702 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 聴覚機能障害用医薬

#### 発明の属する技術分野

本発明は、遺伝子治療等に用いられる、難聴のような聴覚機能障害の予防薬、治療乃至は改善薬として好適な聴覚機能障害用医薬に関する。

#### 従来技術

聴覚障害は、人間にとって最も一般的な感覚欠損であり、10人中1人以上が罹患すると言われている。聴覚障害は、例えばアミノグリコシド系抗生物質やシスプラチン（CDDP）のような耳毒性薬剤、騒音及び加齢を含む様々な要素によって引き起こされる可能性がある。

これらの要素は、聴覚シグナルを収集し、聴覚ニューロンを介して脳に転送する聴覚細胞として機能するコルチ器内の内耳有毛細胞に影響を及ぼす。更に、感覚有毛細胞の喪失に続発して聴覚神経の変性が発生し、聴覚の機能障害が悪化するものと考えられる。

一般に、哺乳類脊椎動物における有毛細胞及び聴覚ニューロンは、新しい有毛細胞及びニューロンを産生する出生後の細胞有糸分裂能力を有していない。哺乳類平衡聴覚上皮では、*in vivo* 前庭受容体については低レベルの再生が可能である。しかし、*in vitro* の新生児マウス蝸牛において極めて限定された再生が観察されたことを除いて、*in vivo* での聴覚感覚上皮の再生は観察されていない。

重度の難聴を治療する目的で、人工内耳が患者にとって大きな利益を提供し、効果的に関与することは証明されているが、人工内耳の利点を享受できるかどうかは聴覚神経集団の質及び量に左右され、聴覚神経集団の消失は聴覚上の利点を

大きく低下させる。

これまでに実施された試験で、刺激に利用できる生存聴覚ニューロンの総数と人工内耳を装着した被験者の聴力との間に明確な関係があることが証明されており、これは、人工内耳が必ずしも満足できる結果を生み出せないことを示している。

このため、人工内耳の有効性を高めるには、聴覚ニューロンを保存又は再生する治療方法を開発することが不可欠である。近年の試験では、例えば神経成長因子 (NGF: nerve growth factor)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF: Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)、脳由来成長因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor)、ニューロトロフィン-3 (NT-3: neurotrophic factor-3) 及び NT-4/5 のような多数の神経栄養因子が螺旋神経節細胞 (S G C s) を含む内耳聴覚ニューロンの生存に影響を及ぼすことが証明されている。

本発明に関連する先行技術である US-A 6, 136, 785 には、脊椎動物に成長因子又はその混合物を投与することによって、アミノグリコシドのような耳毒性薬剤により引き起こされる損傷から内耳の感覚毛細胞を保護する方法が開示されている。その他の関連する先行技術としては、WO-A 98/00014、US-B 6, 017, 886、JP-A 2002-503687 等が知られている。

#### 発明の開示

本発明は、聴覚ニューロンを保存又は再生することで、聴覚機能障害を予防、治療等できる聴覚機能障害用医薬を提供することを課題とする。

本発明者は、肝細胞増殖因子 (HGF; Hepatocyte Growth Factor) 遺伝子が聴覚障害を治癒させることに有効な治療物質であることに注目し、研究を重ね、本発明を完成した。

請求項 1 の発明は、課題の解決手段として、肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺

伝子を有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 2 の発明は、課題の他の解決手段として、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 3 の発明は、課題の他の解決手段として、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 4 の発明は、課題の他の解決手段として、ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる 1 種である、請求項 3 記載の聴覚機能障害用医薬を提供する。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、聴覚機能障害の予防薬、聴覚機能障害の治療又は症状の改善薬として適しており、特に難聴のための遺伝子治療用医薬として適している。

本発明は肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの聴覚機能障害用医薬を製造する用途または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの治療に有効な量を聴覚機能障害を有する患者に投与することによる聴覚機能障害を治療する方法を提供する。

本発明でいう「肝実質細胞増殖因子（HGF）」は、様々な薬理作用を示す配列表の配列番号 1 で示される生理活性ペプチドであり、その薬理作用については、例えば、実験医学 Vol. 10, No. 3（増刊）330-339（1992）に記載されており、WO-A 97/7824 においても、従来技術として様々な用途が記載されているが、聴覚機能障害に対する薬理作用については、全く知られていない。

## 発明の詳細な説明

本発明の聴覚機能障害用医薬に有効成分として含有される肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子は、HGFを発現できる遺伝子をいい、具体的には配列表の配列番号2で示される。この遺伝子には、発現されるポリペプチドがHGFと実質的に同じ効果を奏する限り、その遺伝子配列の一部が欠失したり、他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5'末端及び／又は3'末端に塩基が結合したりしたような遺伝子も包含される。

このようなHGF遺伝子としては、Nature, 342, 440 (1989), JP-A 5-111383、WO-A 90/10651, Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)等に記載のHGF遺伝子を用いることができる。

HGF遺伝子は、適当なベクター、好ましくはHGF遺伝子をプラスミドに組み込んだものを用いることができる。

HGF遺伝子は、RNAを取り除いたウイルスの膜（ウイルスエンベロープ）にHGF遺伝子を封入したもの、又はHGF遺伝子をプラスミドに組み込んだものを封入したウイルスエンベロープベクターを用いることができる。

ここで用いるウイルスは、野生型ウイルスであっても、組み替え型ウイルスであっても良い。このウイルスとしては、センダイウイルス（HVJ）、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる1種が好ましい。これらの中でも、HVJがより好ましく、特に不活性化HVJが好ましい。この不活性化とは、ゲノムを不活性化したウイルスである。

なおセンダイウイルスとして具体的には、例えばVR-105, VR-907等をP. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA 在のAmerican Type Culture Collection (ATCC), telephone 1-703-365-2700 から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376>, VR-

105&text=Sendai&max=20

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

ウイルスエンベロープベクターとしては、WO-A 01/57204 に開示されたHVJ エンベロープベクターを用いることができる。

本発明の聴覚機能障害用医薬の剤型は、投与方法との関連において決定されるが、本発明においては注射薬とすることが好ましい。

本発明の聴覚機能障害用医薬を注射薬とするときは、HGF 遺伝子、HGF 遺伝子のプラスミド、又は肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターと、薬学的に受容可能なキャリア（滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、緩衝液等）とを混合することで製造できる。

キャリアには、等張性及び化学的安定性を増強する物質のような微量の添加物を適宜含有させることができる。このような物質は、使用された投薬量及び濃度において、患者に対して非毒性であるものである。

このような物質としては、リン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、その他の有機酸又はこれらの塩のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニン又はトリペプチド）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、イムノグロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン）；単糖、二糖及び他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、蔗糖、デキストリン、セルロース又はその誘導体）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）；対イオン（例えば、ナトリウム）；非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート、ポロキサマー）；ポリエチレングリコール等を挙

げることができる。

本発明の聴覚機能障害用医薬を注射薬とするときは、密封アンプル又はバイアルにより、乾燥体および溶解液として別々に、あるいは水溶液として保存する。

本発明の聴覚機能障害用医薬を人に投与するときの投与部位は、例えば注射薬の場合、内耳内に蝸牛経由で直接投与する方法、内耳内に半規管経由で直接投与する方法、脳脊髄液内に投与し、内耳へ伝達させる方法、中耳内に投与し、内耳へ浸潤させる方法、人工内耳挿入手術の際に挿入電極に付着させる、又は除放させる装置を組み込み、内耳内へ直接投与する方法等を適用できる。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、医療実施基準に一致した様式で、個々の患者の臨床状態（例えば、予防又は処置されるべき状態）、投与方法、投与部位、投与計画及び当業者に公知の他の因子を考慮しつつ処方され、投与される。従って、本発明の聴覚機能障害用医薬の有効量又は適切な投与量は、このような考慮事項によって決定する。

本発明の聴覚機能障害用医薬の人への投与量は、ウイルスエンベロープベクターを投与する場合、患者の体重1 kg当たり、通常0.001  $\mu$ g $\sim$ 1 g、好ましくは0.01  $\mu$ g $\sim$ 500 mg、より好ましくは0.1  $\mu$ g $\sim$ 100 mgのウイルスエンベロープベクターを投与する。

投与されるウイルスエンベロープベクター中のHGF遺伝子の量は、患者の体重1 kg当たり、通常0.01  $\mu$ g $\sim$ 500 mg、好ましくは0.1  $\mu$ g $\sim$ 10 mg、より好ましくは1  $\mu$ g $\sim$ 1 mgである。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、聴覚機能障害の遺伝子治療用医薬として用いることができ、聴覚機能障害用の予防薬、治療又は症状改善薬として適しており、聴覚機能障害の内、特に難聴用の予防薬、治療又は症状改善薬として適している。

我々は本研究において、ヒト HGF を含む HVJ-E のクモ膜下脳脊髄液中への注入が、アポトーシス抑制により有毛細胞および螺旋神経節細胞の喪失を予防するこ



とを示した。

すなわち、HGF 遺伝子をカナマイシン処置直前に投与することにより聴覚障害を予防することができ、またカナマイシンによる聴覚障害惹起後でも聴覚機能が回復した。

これらの結果は、HVJ-E ベクターを用いる HGF 遺伝子治療の、極めて高い有用性を示している。

内耳への遺伝子移入に関しては、基本的に4つの外科的手法が行われている。

- i) 蝸牛切開術による、蝸牛中への直接注射
- ii) 膜を通した注射あるいは、ベクターを含むジェル (gel) 小片を無傷の膜上に置き浸透させることによる、正円窓膜を通じての投与
- iii) 切開術による、後半規管を通しての内耳内投与
- iv) 内リンパ嚢中への投与

これまでアデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のいくつかのウイルスベクターは、上記4つの手法のいずれかを用い、内耳内に直接投与されてきた。

しかしながらそれぞれの手法は、侵襲性および有効性の観点から、それぞれ利点および欠点を有している。

我々は本研究において、蝸牛への直接注射による内耳への侵襲を避けるため、HVJ-E ベクターをクモ膜下脳脊髄液中に注射した。

この方法により、脳脊髄液中における導入遺伝子の発現を酵素活性および免疫染色により確認し、また脳あるいは耳組織内において有意な損傷を認めなかった。この事実は、HVJ-E ベクターそのものが、クモ膜下脳脊髄液への投与後、内耳内螺旋神経節細胞に到達したことを示唆しており、クモ膜下脳脊髄液から内耳への、いくつかの可能性ある経路が示された。

ベクターを膜内に注入した際、離れた器官において、いかなるルシフェラーゼ

活性も観察されなかったので、クモ膜下脳脊髄液から内耳に到達する最もあり得る経路は、蝸牛管経由だと考えられる。

仮にベクターが血流経由で全身に広まったのであれば、静注後ルシフェラーゼ活性はまず脾臓において認められるので、脾臓や肺のような離れた器官においても導入遺伝子の発現が検出されるはずである。

従来 NGF, BDNF, GDNF and NT-3 等の向神経因子が、聴覚の治療に用いられてきた。

しかしながら、これまで HGF はこの目的には用いられてこなかった。肝臓への効果に加え、海馬、大脳皮質、知覚ニューロン、運動ニューロン等において HGF は向神経活性を示すことが明らかになっているが、今回我々は、ヒト HGF が、クモ膜下脳脊髄液および螺旋神経節細胞の相方に認められ、それがラットの内因性 HGF を誘導したことを示した。

聴覚系への HGF 遺伝子治療は、ニューロトロフィンを利用する従来の遺伝子治療法に勝るいくつかの利点を有すると思われる。

また人工内耳と HGF 遺伝子治療の併用、すなわち人工内耳手術中に HGF 遺伝子を投与することも効果的であろう。

聴覚障害は有毛細胞および螺旋神経節細胞の喪失を伴い、これらの喪失予防はアポトーシスによる細胞死に対する HGF の保護作用によりなされる。

HGF の発現は、カナマイシン処置による聴覚障害惹起後の機能回復にも効果的であった。

このように、知覚神経性の聴覚障害治療にあたり、HGF 遺伝子治療は可能性の高い方法の一つである。

本研究は、HGF 遺伝子と HVJ-E ベクター送達システムの組み合わせにより、聴覚障害治療のための新たな知見と手法を与えるものである。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、特に難聴の予防、治療等を目的とした遺伝子

治療用の医薬として好適である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例の聴覚機能試験における聴覚機能の経日変化を示すグラフである。

図 2 は、実施例の聴覚機能試験における聴覚機能の経日変化を示すグラフである。

図 3 a は無傷の螺旋神経節細胞の顕微鏡写真、図 3 b はカナマイシン処置群の顕微鏡写真、図 3 c はカナマイシン+HGF 処置群の顕微鏡写真である。

図 4 は、カナマイシン+HGF 処置群とカナマイシン+ベクター処置群における、螺旋神経節細胞密度を示すグラフである。

図 5 は、カナマイシン+HGF 処置群とカナマイシン処置群における、螺旋神経節細胞密度を示すグラフである。

#### 実施例

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

##### プラスミド DNA の調製

pCMV-lacZ (9.2 kb) は、pSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Promega Corp.、マディソン、ワイオミング州、アメリカ) の HindIII-BamHI フラグメントを、pcDNA3 (5.4 kb) (インビトロゲン、サンディエゴ、カリフォルニア州、アメリカ) 内へ、HindIII-BamHI 部位で挿入することによって構築した。

pCMV-ルシフェラーゼ-GL3 (pCLuc-GL3: 7.4 kb) は、pGL3 ベーシックベクター (プロメガ) からのルシフェラーゼ遺伝子を pcD

NA 3 (インビトロゲン) 内にクローニングすることによって構築した。

pVAX1-hHGF (5.2 kb) は、ヒトHGF cDNAをpVAX1 (3.0 kb) (インビトロゲン) 内にBamHI及びNotI部位で挿入することによって構築した。

プラスミド類は、キアゲン・プラスミド単離キット (キアゲン、ヒルデン、ドイツ) を用いて精製した。

#### HVJ-エンベロープベクターの調製

センダイウイルス (HVJ ; Hemagglutinating virus of Japan) エンベロープベクター (HVJ-E) は、W0-A 01/57204 の実施例 8 に準じて、プラスミド DNA を不活化HVJ 粒子内に組み込むことによって調製した。但し、HVJ は遠心分離により精製し、紫外線照射により不活性化した。

#### HVJ-E懸濁液 (本発明の聴覚機能障害用医薬) の調製

10,000 赤血球凝集単位であるUV不活化HVJ (Z菌株) を、200  $\mu$ g のプラスミドDNA及び0.3%トライトンXと混合し、平衡生理食塩液 (BSS : 137mMのNaCl、5.4mMのKCl、10mMのTris-HCl、pH7.6) を用いて洗浄し、クモ膜下注入のためにBBSを用いて100  $\mu$ Lに調製した。本実施例では、pCMV-lacZ、pGLuc-GL3、pVAX1-hHGF、pCDNA3又はpVAX1プラスミドDNAを含有するHVJ-Eを使用した。

#### 実験動物及び処置群

正常なプライエル反射を示すSprague-Dawley系雄性ラット (6週齢 ; 体重200~210g) を日本Charles River社から入手した。すべての処置は、大阪大学実験動物委員会ガイドラインに従って実施した。

動物は、保護群、救済群、保護/救済群、ベクター対照群及び非処置群の5つの群に分けた。全群の動物は、アミノグリコシド中毒によって両耳の聴覚を喪失

させ、硫酸カナマイシン（明治製菓、東京）を連続14日間に渡り、皮下注射（400mg/kg/日）によって投与した。

保護群及び保護／救済群には、カナマイシン処置の初日にhHGF遺伝子（pVAX1-hHGF）を含有するHVJ-E懸濁液をクモ膜下注入した。

ベクター対照群には、上記と同一方法でクモ膜下注入により、対照ベクター（pVAX1）を含有するHVJ-E懸濁液を投与した。

救済群及び保護／救済群には、カナマイシン処置の最終日（第14日）にpVAX1-hHGFを含有するHVJ-Eを注入した。

更に、組織化学的解析及びルシフェラーゼ定量のため、pCMV-lacZ又はpCLuc-GL3を含有するHVJ-Eを動物に投与した。

このような処置後、トランスフェクション7日後にβ-ガラクトシダーゼの発現を観察し、トランスフェクションの1日後にルシフェラーゼ活性を測定した。

#### クモ膜下腔への in vivo 遺伝子導入

本試験では、CNS及び内耳内への in vivo 遺伝子導入法として、HVJ-Eの注入を使用する小脳延髄槽内への遺伝子導入法を実施した。

クモ膜下腔内へ注入するために、ケタミン（三共、日本）及びキシラジン（バイエル）を用いて動物に麻酔をかけた後、各動物の頭部を腹臥位で固定し、後頭脳正中線切開部を通して環椎後頭膜を露出させた。

ステンレス製カニューレ（27ゲージ；ベクトン・ディッキンソン）を小脳延髄槽（クモ膜下腔）内へ挿入し、カニューレの位置を確認して、脳内圧上昇を回避するために脳脊髄液（100μL）を取り出した後、マーカー遺伝子、hHGF遺伝子又は対照ベクターを含有するHVJ-E（100μL）を50μ/minの速度で注入した。

その後30分間は、動物の頭部を下に向けておいた。投与後に体重減少、活動低下又は行動変化を示したラットはいなかった。

### ルシフェラーゼ活性についての定量

ルシフェラーゼ遺伝子がトランスフェクトされたラットを、トランスフェクション24時間後に麻酔下で屠殺した。器官（脳、肺、脾臓、肝臓及び蝸牛）を採取し、個別に50 mLファルコンチューブ内に入れた。

ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼ・アッセイキット（プロメガ）を用いて測定した（44 of HVJ-E）。組織抽出物のタンパク質濃度を測定することによってルシフェラーゼレベルを標準化した（44 of HVJ-E）。ルシフェラーゼ単位は、組織タンパク質1 g当たりの相対発光量（RLU）として表した。

### 脳脊髄液中のヒトHGFについての酵素免疫測定法

本試験には、hHGF遺伝子を含有するHVJ-Eの注射の5日及び14日後にラットから採取した脳脊髄液（CSF）（100  $\mu$ L）を使用した。

CSF中のヒトHGF及びラットHGFの濃度は、抗ヒト及び抗ラットHGF抗体を使用するエンザイムイムノアッセイによってアッセイキットの製造業者（免疫研究所、東京）の取扱説明書に従って測定した。

ヒトHGFに対する抗体は、ヒトHGFとのみ反応し、ラットHGFとは反応しなかった。ラットHGFに対する抗体は、ヒト及びラットHGFの両方と反応した。

### 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

エーテルを用いてラットに深い麻酔をかけ、断頭し、側頭骨を低温リボヌクレアーゼ無含有生理食塩液中に入れた。耳嚢を除去し、解剖顕微鏡下で全蝸牛を単離した。ラットからの組織を溶解緩衝液中にプールし、ホモジナイザーを使用してホモジナイズし、RNeasy Mini Kit（キアゲン）を使用して全RNAを単離した。RT-PCR用のSuperScript第1鎖合成システム（インビトロゲン）を用いてRNAを逆転写させた。

ヒトHGF及びGAPDHに対する特異的プライマー：HGF、上流プライマー5'-TTCACAAGCAATCCAGAGGTACGC-3'、下流プライマー5'-GAGGGTCAAGAGTATAGCACCATG-3'；GAPDH、上流プライマー5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'、下流プライマー5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'（以上それぞれ配列表の配列番号3、4、5および6）を使用して、第1鎖cDNAを増幅させた。

PCR条件は、各セットのプライマーに対して最適化した。PCR反応混合液は、5  $\mu$ LのcDNA、5  $\mu$ Lの10 $\times$ PCR緩衝液、4  $\mu$ Lの2.5mMのdNTP、2.5  $\mu$ Lの20 pM上流及び下流プライマー、及び1.5 UのTaqポリメラーゼを含有しており、45  $\mu$ Lとなるまで蒸留水を添加した。

加熱サイクル条件：HGF、94 $^{\circ}$ Cで45秒間、70 $^{\circ}$ Cで2分間及び72 $^{\circ}$ Cで2分間；GAPDH、94 $^{\circ}$ Cで45秒間、58 $^{\circ}$ Cで1分間及び72 $^{\circ}$ Cで2分間。

#### 聴覚機能の評価

聴覚機能の生理的状态を評価するために、聴性脳幹反応（ABR）聴力検査を実施した。

ABRsは、ベースライン値を測定するためにカナマイシン投与初日の前日に測定し、更にカナマイシン処置開始から7、14、21、28及び56日後に再度記録した。

聴覚機能の各試験前に、動物にはケタミン（50mg/kg）-キシランジン（10mg/kg）溶液の筋肉内注射により麻酔をかけた。針電極を同側右耳翼（参照電極）、対側耳翼（接地電極）及び頭頂（能動電極）の皮下に配置した。全記録は防音室にて、日本光電製Neuropack IV（MEM-4104）システムを用いて実施した。

単一波長100  $\mu$ secのクリック音（10/sec）によって電位を誘発し、こ

これらのモノラル刺激をラウドスピーカーによって右耳へ送達した。反応をデジタルフィルタリングし（バンドパス：50～3,000 Hz）、増幅させ、500回の反応を平均化した。

聴覚閾値及びP 1波の待ち時間は、各前試験値との比較によって評価し、計算した。刺激強度は、閾値を測定するために2 dBずつ段階的に上昇させて変化させた。閾値は、反応再現性を確認するために連続2回の試験で反応を記録できる最低強度レベルであると定義されている。結果を図1、図2に示す。

図1は、0日から56日間の閾値（dB）であり、図2はI波潜時（mS）を示す。なお、図中のHGFは保護群、保護／救済群、救済群を示し、図中のVecはベクター対照群を示し、図中のKMは非処置群を示す。

図1、図2から明らかなとおり、保護群、保護／救済群、救済群は、56日経過後においても聴覚の変化（閾値及びI波潜時の変化）は僅かであったが、ベクター対照群と非処置群では、聴覚の変化（閾値及びI波潜時の変化）が顕著であった。

図3に、蝸牛（うずまき管）の螺旋神経節細胞（SGC）の光学顕微鏡写真を示す。図3 aは無傷の蝸牛のもの、図3 bはカナマイシン処置群（非処置群）のもの、図3 cはカナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）のものである。

図3 a～cから明らかなとおり、カナマイシン+HGF処置群の螺旋神経節細胞は、カナマイシン処置群の比べると、無傷のものに近かった。

図4に、カナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）とカナマイシン+ベクター処置群（ベクター対照群）における、螺旋神経節細胞密度（10,000 mm<sup>2</sup>当たりの細胞数）を示す。

図5に、カナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）とカナマイシン処置群（非処置群）における、螺旋神経節細胞密度（10,000 m



m<sup>2</sup>当たりの細胞数)を示す。

図4、図5から明らかなとおり、カナマイシン+HGF処置群は、他の処置群に比べて、螺旋神経節細胞密度が高かった。

以上の結果は、HVJ-E懸濁液の投与により、聴覚ニューロンが保存又は再生された結果であると推定される。

## 請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
2. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
3. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
4. ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる1種である、請求項3記載の聴覚機能障害用医薬。
5. 聴覚機能障害が難聴である、請求項1～4のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
6. 聴覚機能障害の予防薬である、請求項1～5のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
7. 聴覚機能障害の治療又は改善薬である、請求項1～5のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
8. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの聴覚機能障害用医薬を製造する用途。
9. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの治療に有効な量を聴覚機能障害を有する患者に投与することによる聴覚機能障害を治療する方法。

図 1

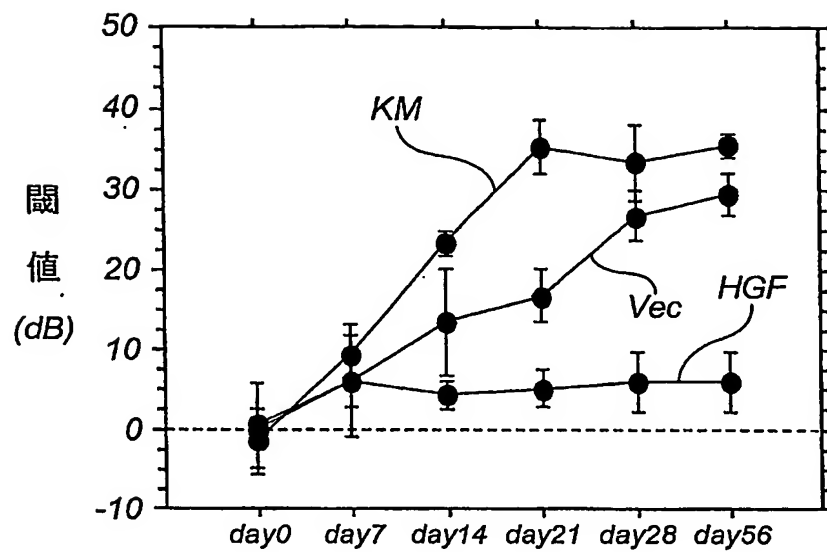


図 2

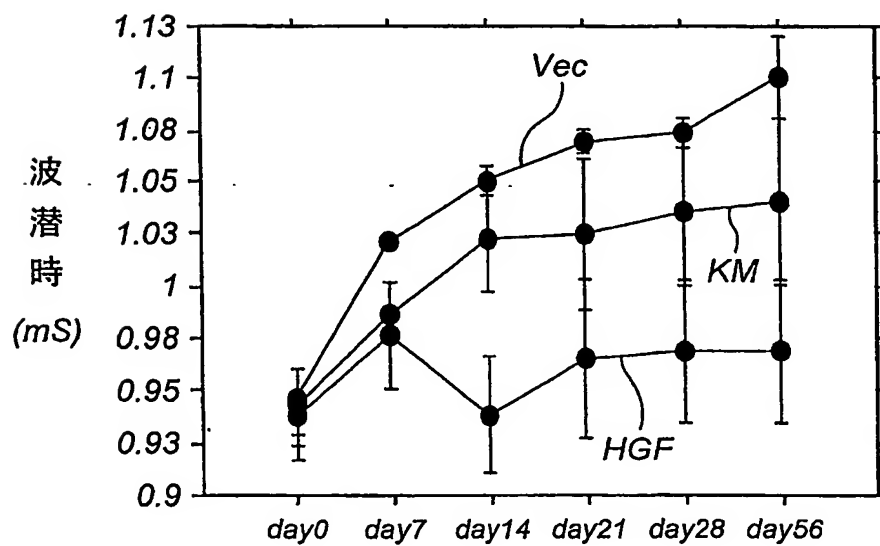


図 3



図 4

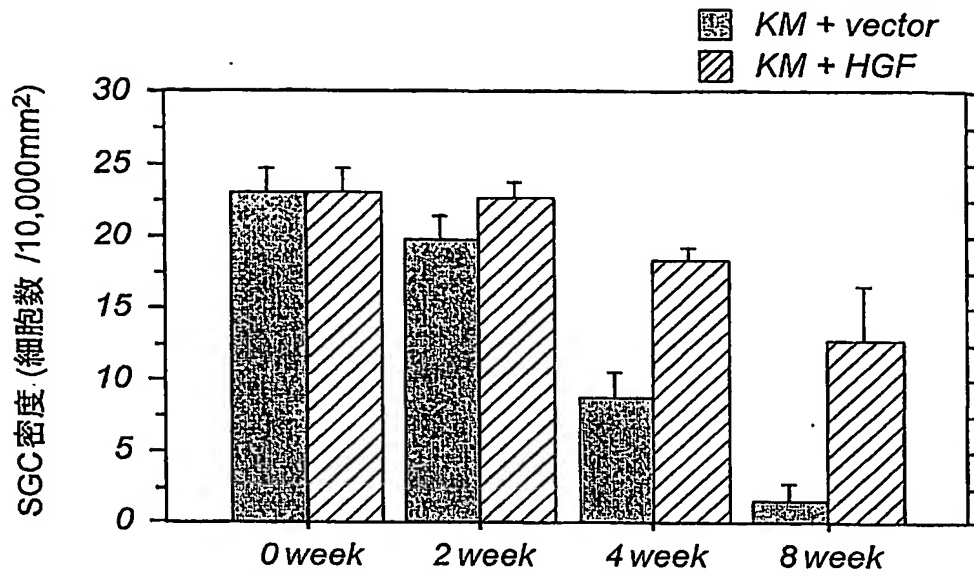
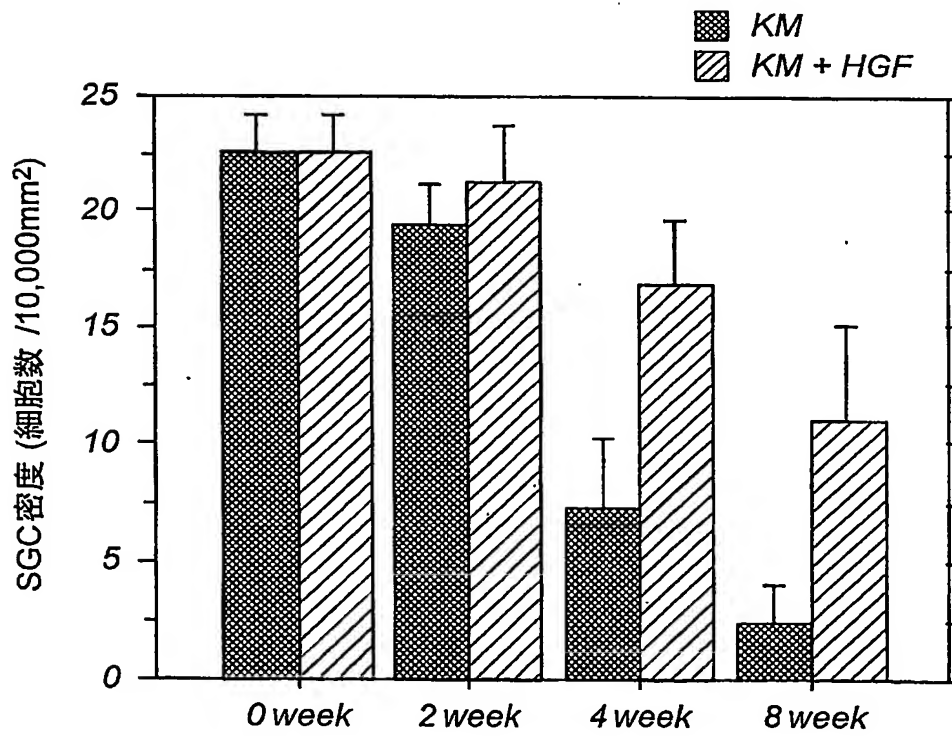


図 5



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; AnGes MG, Inc.

&lt;120&gt; Medicine to impediment to auditory functioning

&lt;130&gt; 03059PCT

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 728

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
  1             5             10             15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
      20             25             30
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
      35             40             45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
  50             55             60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
  65             70             75             80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
      85             90             95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
      100            105            110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
      115            120            125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
      130            135            140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
      145            150            155            160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
      165            170            175
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
      180            185            190
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
      195            200            205

```

Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp  
 210 215 220  
 His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
 225 230 235 240  
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp  
 245 250 255  
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr  
 260 265 270  
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys  
 275 280 285  
 Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu  
 290 295 300  
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile  
 305 310 315 320  
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu  
 325 330 335  
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn  
 340 345 350  
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr  
 355 360 365  
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp  
 370 375 380  
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met  
 385 390 395 400  
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp  
 405 410 415  
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala  
 420 425 430  
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His  
 435 440 445  
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys  
 450 455 460  
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu  
 465 470 475 480  
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val  
 485 490 495  
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg  
 500 505 510  
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp  
 515 520 525

Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr  
 530 535 540  
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys  
 545 550 555 560  
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly  
 565 570 575  
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp  
 580 585 590  
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu  
 595 600 605  
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn  
 610 615 620  
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu  
 625 630 635 640  
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu  
 645 650 655  
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp  
 660 665 670  
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu  
 675 680 685  
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly  
 690 695 700  
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile  
 705 710 715 720  
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser  
 725

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2187

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcattctcctc 60  
 ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120  
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180  
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240  
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300  
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360  
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420



```

tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtagc ctacgaagtc 600
tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga 660
ggctctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
cgcaatcccc atggccagcc gaggccaatg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg 840
gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt 960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020
cctgaaaatt tcaagtcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
gaatcacctt ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200
ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
cgaaatccag atgatgatgc tcatggacct tgggtctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgatacca cactacaat agtcaattta 1440
gaccatcccc taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaa tgggattcca 1500
acacgaacaa acataggatg gatggtagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
ttgaaagatt atgaagcttg gcttggaaat catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
ttaatgaagc ttgccaggcc tgcigtccig gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
aaatgcagcc agcatcatcg agggaagggt actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag 2040
caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
aatcgtcctg gtatTTTTgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

```

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA

<400> 3

TTCACAAGCA ATCCAGAGGT ACGC

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 4  
GAGGGTCAAG AGTATAGCAC CATG  
20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 5  
TGAAGGTCGG AGTCAACGGA  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 6  
GATGGCATGG ACTGTGGTCA  
20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12674

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/00, A61P27/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/00, A61P27/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tetsuro WADA et al., "Kansaibo Zoshoku.Inshi (HGF) no Kyodaion Jushosei ni Ataeru Eikyo", Audiology Japan, Vol.41, No.5, 1998, pages 355 to 356	1-8
Y	WO 97/30722 A (Amjen Inc.), 28 August, 1997 (28.08.97), Full text & US 5929041 A & US 5837681 A & CA 2217565 A & AU 691443 B & EP 822829 B & CN 1181704 A & JP 11-504351 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
01 December, 2003 (01.12.03)

Date of mailing of the international search report  
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12674

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/06064 A (Amgen Inc.), 11 February, 1999 (11.02.99), Full text & US 6043221 A & AU 9886582 A & EP 1005358 B & EP 1304119 A & US 6274554 B & JP 2001-525316 A	1-8
Y	WO 98/19700 A (Genentech, Inc.), 14 May, 1998 (14.05.98), Full text & US 6593290 B & AU 724988 B & EP 948349 B & CN 1251531 A & JP 2002-514191 A	1-8
Y	WO 02/22162 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 27 March, 2002 (27.03.02), Full text & JP 2002-087983 A & US 2003-176347 A	1-8
Y	WO 00/55195 A (The Regents of the University of California), 21 September, 2000 (21.09.00), Full text; in particular, table 3; Neuroactive agents which may be used in conjunction with Slit-N polypeptides & EP 1161441 A & AU 754982 B & JP 2002-539218 A	1-8
Y	Flavio Maina et al., Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons, Genes & Development, Vol.11, pages 3341 to 3350, 1997	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12674

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 9 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 48/00, 38/00, A61P 27/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 48/00, 38/00, A61P 27/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	和田哲朗ら, 肝細胞増殖因子 (HGF) の強大音受傷性に与える影響, Audiology Japan, Vol. 41, No. 5, 1998, p. 355-356	1-8
Y	WO 97/30722 A (アムジェン・インコーポレーテッド) 1997. 08. 28, 全文 &US 5929041 A &US 5837681 A &CA 2217565 A &AU 691443 B &EP 822829 B &CN 1181704 A &JP 11-504351 A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 12. 03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子



4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/06064 A (アムジェン・インコーポレーテッド) 1999. 02. 11, 全文 &US 6043221 A &AU 9886582 A &EP 1005358 B &EP 1304119 A &US 6274554 B &JP 2001-525316 A	1-8
Y	WO 98/19700 A (ジェネンティック, インコーポレーテッド) 1998. 05. 14, 全文 &US 6593290 B &AU 724988 B &EP 948349 B &CN 1251531 A &JP 2002-514191 A	1-8
Y	WO 02/22162 A (住友製薬株式会社) 2002. 03. 27, 全文 &JP 2002-087983 A &US 2003-176347 A	1-8
Y	WO 00/55195 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2000. 09. 21 全文、特にTable3. Neuroactive agents which may be used in conjunction with Slit-N polypeptides, &EP 1161441 A &AU 754982 B &JP 2002-539218 A	1-8
Y	Flavio Maina et al., Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons, Genes & Development, Vol.11, p.3341-3350, 1997	1-8

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲9は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。